MANUAL DE INSTRUCCIONES

REDIAR®

Anti-Globulina Humana Poliespecífico (policlonal de conejo + monoclonal de ratón) Anti-IgG Humano Monoespecífico (policlonal de conejo) Anti-C3 Humano (monoclonal de ratón)

Para uso diagnóstico in vitro

INTRODUCCIÓN
Cuando anticuerpos "incompletos" (generalmente de tipo IgG) entran en contacto con eritrocitos que poseen los antígenos apropiados, se adhieren sobre la superficie celular, y permanecen unidos a través de una serie de lavados con salina para remover la proteína humana no unida. La presencia de este recubrimiento proteico puede detectarse entonces ensayando las células lavadas con un reactivo preparado a partir de suero de conejo inmunizado con la proteína humana apropiada, o a partir de anticuerpos monoclonales secretados por células de hibridomas (derivados de ratones inmunizados), cultivadas en un medio fluido. Estos reactivos han sido desarrollados por Diagnostic Scotland en colaboración con el Servicio Nacional de Transfusión de Sangre de Escocia. El reactivo Anti-IgG se prepara mezclando anticuerpos de conejo anti-IgG humana y prediluyendo esta mezcla para una óptima detección de la IgG por las pruebas antiglobulina directa e indirecta. El reactivo Anti-C3 se prepara utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (clase IgG) prediluyéndolo para una óptima detección de los componentes C3b y/o C3d del complemento en la superficie de los eritrocitos. El reactivo antiglobulina humana poliespecífico se prepara mezclando los dos anticuerpos antes mencionados y prediluyendo esta mezcla para una óptima detección de la IgG y los anticuerpos de grupo sanguíneo fijadores de complemento por las pruebas antiglobulina directa e indirecta.

REACTIVOS
El anticuerpo monoclonal anti-C3 fue desarrollado por Diagnostic Scotland y se le ha dado el número de clon de referencia SAPU/3G8.
Los reactivos se diluyen en buffer de fosfatos salina (PBS) que contiene 10 g/l de albúmina bovina, 1 g/l de azida sódica y 0,1 g/l de Twwen 80. El reactivo poliespecífico contiene además Patent Blue (0,02 g/l) y Ariavit Tartrazine (0,08 g/l) como colorantes. Finalmente, los reactivos se filtran por membrana de 0,2 µm.
SE DEBEN TOMAR LOS RECAUDOS APROPIADOS PARA EL USO Y ELIMINACIÓN DE ESTE PRODUCTO. La azida sódica es tóxica si se ingiere y también puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre para formar compuestos explosivos.
Estos reactivos son para uso diagnóstico in vitro.
Estos reactivos deben conservarse entre 2 y 8°C. No deben utilizarse si estuvieran turbios y no deben diluirse. No utilizar más allá de su fecha de vencimiento.
El volumen dispensado por el gotero del envase es de aproximadamente 40 µl. Teniendo esto en cuenta, se deben tomar los recaudos necesarios para asegurar que se mantenga la relación suero:células en todos los sistemas de ensayo.
Estos reactivos cumplen con las recomendaciones contenidas en el Volumen III Parte 4 de los Lineamientos para los Servicios de Transfusión de Sangre del Reino Unido.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
Las muestras deben ser obtenidas por una técnica aséptica con o sin anticoagulante. Las muestras deben ser analizadas lo antes posible, una vez obtenidas. Si el análisis se va a demorar, las muestras deberían conservarse a 2 - 8°C. Las muestras de sangre que presenten contaminación o hemólisis grosera no deberían ser utilizadas. Las muestras coaguladas u obtenidas con EDTA deben ser analizadas dentro de los siete días de su recolección. La sangre de donantes puede ser analizada hasta su fecha de vencimiento.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO
Información general
▪ Este reactivo ha sido estandarizado para el uso mediante las técnicas descriptas a continuación; por lo tanto, su desempeño en el uso mediante otras técnicas no puede ser garantizado. Se recomienda especialmente al usuario confirmar si este reactivo es adecuado antes de utilizarlo en técnicas alternativas.

TÉCNICAS RECOMENDADAS
Pruebas en fuerza iónica normal (NIS)
Prueba Antiglobulina indirecta, NIS, 37°C:
1. Colocar 2 volúmenes de reactivo hemoagrupador en un tubo de ensayo de vidrio de 12 (ó 10) x 75 mm
2. Agregar 1 volumen de glóbulos rojos suspendidos al 2-3% en solución de fuerza iónica normal.
3. Homogeneizar bien la mezcla de reacción e incubar a 37°C por 60 minutos
4. Lavar la prueba 4 veces con abundante cantidad de PBS pH 7,0±0,2 (p. ej. 4 ml de PBS por cada tubo). NOTAS: a) permitir el suficiente tiempo de centrifugado como para que sedimenten los eritrocitos; b) asegurarse de remover la mayor cantidad posible de salina al final de cada lavado, de manera tal de obtener un botón celular "seco".
5. Agregar dos gotas de reactivo antiglobulina (poliespecífico, monoespecífico anti-IgG o monoespecífico anti-C3) a cada tubo y mezclar bien.
6. Centrifugar a 1000 g por 10 segundos o a otra combinación adecuada de g y tiempo
7. Agitar suavemente el tubo a fin de deshacer el botón celular en el fondo del mismo y observar macroscópicamente si hay aglutinación.

PRUEBA ANTIGLOBULINA DIRECTA
1. Colocar 1 volumen de glóbulos rojos suspendidos al 2-3% en solución de fuerza iónica normal.
2. Agregar dos gotas de reactivo antiglobulina (poliespecífico, monoespecífico anti-IgG o monoespecífico anti-C3) a cada tubo y mezclar bien.
3. Centrifugar a 1000 g por 10 segundos o a otra combinación adecuada de g y tiempo
4. Agitar suavemente el tubo a fin de deshacer el botón celular en el fondo del mismo y observar macroscópicamente si hay aglutinación.

Pruebas en baja fuerza iónica (LIS)
Prueba Antiglobulina indirecta, LISS, 37°C:
1. Colocar 2 volúmenes de reactivo hemoagrupador en un tubo de ensayo de vidrio de 12 (ó 10) x 75 mm
2. Agregar 2 volúmenes de glóbulos rojos suspendidos al 1,5 – 2 % en LISS.
3. Homogeneizar bien la mezcla de reacción e incubar a 37°C por 15 - 20 minutos
4. Lavar la prueba 4 veces con abundante cantidad de PBS pH 7,0±0,2 (p. ej. 4 ml de PBS por cada tubo). NOTAS: a) permitir el suficiente tiempo de centrifugado como para que sedimenten los eritrocitos; b) asegurarse de remover la mayor cantidad posible de salina al final de cada lavado, de manera tal de obtener un botón celular "seco".
5. Agregar dos gotas de reactivo antiglobulina (poliespecífico, monoespecífico anti-IgG o monoespecífico anti-C3) a cada tubo y mezclar bien.
6. Centrifugar a 1000 g por 10 segundos o a otra combinación adecuada de g y tiempo
7. Agitar suavemente el tubo a fin de deshacer el botón celular en el fondo del mismo y observar macroscópicamente si hay aglutinación.

NOTAS ADICIONALES
▪ Cada serie de pruebas, antiglobulínicas deberían incluir un control positivo (de sensibilidad) apropiado, p. ej. células R1r sensibilizadas con un anti-Rh (D) débil, para confirmar los resultados negativos de la prueba. Las pruebas en las cuales se obtuvieran resultados negativos por este procedimiento deberían considerarse inválidas y ser repetidas de ser necesario.
▪ La inclusión del colorante verde en el reactivo poliespecífico no es un sustituto del control anterior. La presencia de la coloración solamente indica que el reactivo fue agregado a la prueba, pero no proporciona ninguna información sobre la actividad del reactivo antiglobulina.
▪ El lavado es más efectivo con aproximadamente 4 ciclos de 4 ml de PBS por tubo.
▪ Cualquier resto de PBS presente luego de la serie de lavados puede diluir el reactivo antiglobulina más allá de su concentración óptima de funcionamiento. Por ende, es importante asegurarse de remover la mayor cantidad de líquido de lavado luego de cada paso del mismo.
▪ Si se utilizan lavadores automáticos de células, el funcionamiento y la limpieza de los mismos deben ser verificados frecuentemente.
▪ Las pruebas antiglobulínicas directas deben llevarse a cabo con células frescas obtenidas con EDTA para evitar la sensibilización in vitro con complemento. Si se obtuviera un resultado positivo en una prueba antiglobulínica directa, se puede establecer la especificidad ensayando con reactivos monoespecíficos anti-IgG y anti-C3.
▪ La sensibilidad de la reacción del complemento con el reactivo anti-complemento se puede incrementar incubando 5 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugar.
▪ Los eritrocitos positivos en una prueba antiglobulínica directa no deben utilizarse para una prueba antiglobulínica indirecta.
▪ Las pruebas deben ser leidas por un procedimiento de balanceo y rotación. Una agitación excesiva puede disgregar aglutinaciones débiles y producir resultados falso negativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moreschi C. Neue tatsachen uber die blutkorperchen agglutinationen. Zbl Bakt 1908; 46: 49, 456.
2. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. Detection of weak and incomplete Rh agglutinins: a new test. Lancet 1945;ii:15.
3. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" antibodies. Brit J Exp Pathol 1945; 26:255.
4. Garratty G, Petz LD. The significance of red cell bound complement components in teh development of standards and quality assurance for the anti-complement components of antiglobulin sera. Transfusion 1976; 19:688494.
5. Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-JK sera reacting by the antiglobulin technique. Vox Sang 1983; 45: 129-138.
6. ISBT/ICSH Working Party. International reference polyspecific antihuman globulin reagents. Vox Sang 1987; 53: 241-247.
7. Issit PD Applied blood group serology. 3rd edition. Miami: Montgomery Scientific, 1985.
8. Lachman PJ, Pangburn MK, Oldroyd RG. Breakdown of C3 after complement activation. J Exp Med 1982; 156: 205-216.
9. Moore BPL. Serological and immunological methods of the Canadian Red Cross Blood Transfusion Service. 8th edition. Toronto: Hunter Rose, 1980.
10. Voak D, Downie DM, Moore BPL et al. Quality control of anti-human globulin test: use of replicate test to improve performance. Bio Bull 1986; 1: 41-52.
11. Wright MS, Issitt PD. Anticomplement and the indirect antiglobulin test. Transfusion 1979; 19: 688-694.
12. Walker RH, ed. Technical manual. 11 th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks,1993.



ELABORADO POR: Diagnostics Scotland, Ellens Glen Road Edinburgh, EH 17 7QT, Escocia
IMPORTADO Y FRACCIONADO POR: FELSAN S.R.L. Palpa 3811, (C1427EBF) Ciudad Aut. de Bs. As. Argentina. Dir. Técnico: Roque Luis Espinosa. **Consultas Técnicas:** laboratorio@felsan.com.ar

PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Certificado Nº 4866. Disposición Nº 3715